



(51) 国際特許分類 C12N 5/08	A1	(11) 国際公開番号 WO98/21313  (43) 国際公開日 1998年5月22日(22.05.98)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03797</p> <p>(22) 国際出願日 1997年10月21日(21.10.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/296041 1996年11月8日(08.11.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 十河真司(SOGO, Shinji)(JP/JP) 〒770 徳島県徳島市中昭和町2丁目39番地の1 ローレルハイツ中村205号 Tokushima, (JP) 山西一也(YAMANISHI, Kazuya)(JP/JP) 〒770 徳島県徳島市大原町東千代ケ丸19-139 Tokushima, (JP) 足立正一(ADACHI, Masakazu)(JP/JP) 〒370 群馬県高崎市石原町3493-9 Gunma, (JP) 池原 進(IKEHARA, Susumu)(JP/JP) 〒534 大阪府大阪市都島区友渕町1丁目5-8-1004 Osaka, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述</p>	
<p>(54)Title: METHOD FOR CULTURING HEMATOPOIETIC STEM CELLS</p> <p>(54)発明の名称 造血幹細胞の培養方法</p> <p>(57) Abstract A novel liquid culture technique for hematopoietic stem cells for which no effective culture technique has hitherto been established. A method for culturing hematopoietic stem cells, characterized by subjecting human hematopoietic stem cells, with the phenotype thereof being characterized as CD34<sup>+</sup> and c-kit, to liquid culturing in the presence of a hematopoietic stem cell growth factor in an adhesive incubator; and hematopoietic stem cells which are useful for clinical applications and studies and are propagated and harvested by the above method.</p>		

本発明は、従来効果的な培養技術が確立されていなかった造血幹細胞に対する新しい液体培養技術を提供することを目的とする。本発明は、造血幹細胞増殖因子の存在下に、表現型がCD34<sup>+</sup>及びc-kit<sup>-</sup>として特徴づけられるヒト造血幹細胞を、付着性培養器により液体培養することを特徴とする造血幹細胞の培養方法、及び該方法によって増殖取得される臨床並びに研究において有用な造血幹細胞である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	英国	MC	モナコ	TD	チャド
AU	オーストラリア	GG	グンナ	MD	モルドバ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ギニア	MK	マケドニア共和国	TM	トルクメニスタン
BB	バハマ	GN	ギニア・ビサウ			TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GU	グアム	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	HE	ハイチ	MR	モロッコ	UG	ウガンダ
BM	バミューダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
BN	ブルネイ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
BO	ボリビア	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ベトナム
BR	ブラジル	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
BS	バハマ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
BT	ブータン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
BV	ブーヴィエ	KG	キルギス	PL	ポーランド		
CC	ココス (キリング)	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CD	コンゴ	LA	ラオス	RO	ルーマニア		
CF	中央アフリカ共和国	LC	セント・ルシア	RU	ロシア		
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
CH	スイス	LR	リベリア	SG	シンガポール		
CI	コートジボワール	LS	レソト	SK	スロバキア		
CM	カメルーン			SL	シエラレオネ		
CN	中国						
CO	コロンビア						
CR	コスタリカ						
CY	キプロス						
CZ	チェコ						
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						
EE	エストニア						
ES	スペイン						

## 明 細 書

### 造血幹細胞の培養方法

#### 技 術 分 野

- 5       本発明は、ヒト造血幹細胞の新しい培養方法に関する。

#### 背 景 技 術

- 造血幹細胞とは、自己複製能及び全ての成熟血球に分化する能力を持った細胞と定義される。その大部分は、  
10 造血支持能を有する骨髓ストローマ細胞に接着した態様で、骨髓に存在しているものと考えられる。そして僅かではあるが、造血幹細胞は定常状態において末梢血中にも存在しており、化学療法後の骨髓回復期や造血刺激因子 C S F (colony-stimulating factor) の投与後には、  
15 末梢血中の造血幹細胞が著増することが知られている。

また、造血幹細胞は臍帯血中にも存在しており、この臍帯血幹細胞は、骨髓に存在する造血幹細胞に比して高いコロニー形成能を有することが知られている。

- 近年、このような造血幹細胞を、抗体によって同定される特異的なエピトープ部位と関連するマーカー〔例えば、C D 3 3、C D 3 8、C D 1 1 7 (c-kit)、H L A - D R 等のマーカー〕の存在の有無を指標として、特定  
20

しようと試みられている。かかる方法によって、現在、ヒトの造血幹細胞に関しては、表現型として  $CD34^+CD33^-$ 、 $CD34^+CD38^-$  と示される分画等が、造血幹細胞に該当するのではないかと考えられている。

5      また最近、stem cell factor (SCF) のレセプターである  $CD117$  (c-kit) をメルクマールとする特定法を用いた、羊に対する *in vivo* 実験において、 $CD34^+c-kit^{low}$  細胞が、移植可能な造血幹細胞であると報告されている。

10      一方、骨髓ストローマ細胞を用いた *in vitro* 長期培養系において、 $CD34^+c-kit^{low}$  細胞よりも  $CD34^+c-kit^-$  細胞の方が、より長期に培養可能であるとの報告もあり、その結論が待たれる所である。

15      近年、白血病等の疾患に対して、骨髓移植が活発に行なわれている。しかしながら、骨髓移植はドナーに対する負担が大きい等の種々の短所があり、これに対して、末梢血幹細胞または臍帯血幹細胞の移植は、次に述べるような利点がある。

20      即ち、末梢血幹細胞の移植は、(i)アフェレーシスによって自己幹細胞を採取するため、骨髓移植の場合のような麻酔をする必要がなく、全身状態や臓器機能の悪い患者においても施術可能であること、(ii)また、移植術後

の造血回復速度も速く、H L A が一致する正常ドナーからの血小板採取回数も低減でき、患者と移植チームに対する負担が大幅に軽減すること等の利点を有する。

5 また、臍帯血幹細胞の移植は、(i)該細胞が通常廃棄される臍帯から採取されるものであるため、ドナー(donor)への負担が全くないこと、(ii)また、新生児血液であることから採取時にウイルス等の感染の危険性もほとんどなく、移植後の G V H D (graft-versus-host disease) も起こりにくいこと等の利点がある。

10 このように、末梢血幹細胞移植及び臍帯血幹細胞移植は、白血病等の腫瘍性疾患並びに重症再生不良性貧血等の非腫瘍性疾患に対する根治療法として、重要な位置を占めるようになってきている。

かかる造血幹細胞移植の臨床展開と並行して、造血幹  
15 細胞の *ex vivo* 増殖法の開発の重要性が指摘されており  
(小澤敬也：臨床科学 30巻3号、p 315~320 (1994))、  
活発な研究が行なわれている。しかしながら、現在でも  
なお、造血幹細胞を、液体培養によって、その自己複製  
能及び全成熟血球への分化能を維持したままで増殖させ  
20 る技術は、開発されるに至っていない。

僅かにストローマ細胞を用いた系が知られてはいるが、これは以下の如き欠点があり、実用面からは適さないと

考えられる。

即ち、第 1 に造血幹細胞にはストローマ細胞に接着する性質があるため、ストローマ細胞と分離して造血幹細胞を回収することが困難であること、第 2 にストローマ細胞は正と負の両方の増殖調節因子を産生することにより巧妙に造血を制御しているため、造血幹細胞の自己複製刺激作用を選択的に強化することは、細胞レベルでは困難であること等が挙げられる。

また、造血幹細胞の培養技術は、上述した幹細胞移植術の面からのみならず、遺伝子治療の面からもその確立が急務とされている。

事実、遺伝子治療は、現在効果的な治療法のない致死的な遺伝性疾患、ある種の悪性腫瘍、及びエイズのように既存の治療法の成績が極めて悪い疾患に対して、治療効果が期待できること、他の疾患についても既存の治療法より優れた治療法となること等から、新しい治療法として急速に広がりを見せている。

かかる遺伝子治療のための標的細胞として造血幹細胞が選択され、該細胞に遺伝子が導入された場合には、造血幹細胞本来の自己複製能によって遺伝子の発現が永続し、遺伝子による効果も持続するだろうと期待される。このため、遺伝子導入操作を行なう原料となる造血幹細胞

胞を大量に得るべく、*ex vivo*増殖法の確立が斯界で望まれている。

本発明は、従来、効果的な培養技術が確立されていなかった造血幹細胞の*ex vivo*増殖法の提供、具体的には、  
5 移植及び遺伝子療法において有用な造血幹細胞を有意に増殖産生できる新しい液体培養技術を提供することを目的とするものである。

#### 発 明 の 開 示

10 本発明者らは、造血幹細胞として表現型がCD34<sup>+</sup>及びc-kit<sup>-</sup>として特徴づけられる細胞を選択し、これを造血幹細胞増殖因子の存在下で付着性培養器を用いて液体培養することによって得られる培養細胞が、あらゆる成熟血球に分化する能力を保持していることを見出し、  
15 れにより、上記目的に合致する造血幹細胞の培養方法が確立できることを確認して、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、造血幹細胞増殖因子の存在下に、表現型がCD34<sup>+</sup>及びc-kit<sup>-</sup>として特徴づけられるヒト造血幹細胞を、付着性培養器を用いて液体培養すること  
20 を特徴とする造血幹細胞の培養方法である。

また、本発明は、かかる培養方法によって増殖取得される造血幹細胞、特に表現型がCD34<sup>+</sup>及びc-kit<sup>+</sup>とし

## © WPI / DERWENT

- AN - 1998-287920 [26]
- TI - Culture method for CD34+ c-kit- hematopoietic stem cells - uses culture in cell-adhesive culture vessel in presence of stem cell growth factors
- AB - WO9821313 Method for the culture of hematopoietic stem cells (HSC) (such as human umbilical or peripheral HSC) of phenotype CD34+ c-kit-, consists of culture in liquid medium in a cell-adhesive culture vessel in the presence of HSC growth factors (especially colony stimulating factors) such as flt-3 ligand (FL), Interleukin-6, Interleukin-7 and CD34xL.
- The culture vessel is preferably a polystyrene vessel with the culture surface treated to strengthen its cell-adhesive properties. The preferred culture medium is alpha -MEM or IMDM medium containing 10% bovine fetal serum (FBS) and 10% equine serum, and containing 100 ng/ml FL, 10 ng/ml interleukin-6, 10 ng/ml Interleukin-7 and 10 mu g/ml immobilised anti-CD34 antibody.
  - The culture is carried out preferably at 37 deg. C under 5% carbon dioxide.
  - USE - The method is used for the effective culture of HSC for which no satisfactory culture method has previously been available, to give HSC for therapeutic and investigational uses.
  - (Dwg.3/4)
- IN - CULTURE METHOD KIT HAMATOPOIETIC STEM CELL CULTURE CELL ADHESIVE CULTURE VESSEL PRESENCE STEM CELL GROWTH FACTOR
- PN - WO9821313 A1 19980522 DW199826 C12N6/08 Jpn 037pp
- JP10136878 A 19980526 DW199831 C12N6/10 008pp
- IC - C12N6/08 ; C12N6/10
- MC - B04-F02 B04-N02 D05-H08
- DC - B04 D16
- PA - (SAKA ) OTSUKA PHARM CO LTD
- IN - ADACHI M; IKEHARA S; SOGO S; YAMANISHI K
- AP - WO1997JP03797 19971021 JP19960296041 19961108
- PR - JP19960296041 19961108